

Figure 1

In life parameters of dams exposed to ochratoxin A from GD 6 to PND 21 on weaning of offspring. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption. Mean values are plotted. N = 11/group.

Table 1**Body weight changes of male offspring exposed to ochratoxin A**

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.12	0.6	3.0
No. of offspring examined	11	11	11	11
PND 4	11.4±0.8 ^a	11.7±1.0	11.4±1.3	10.8±0.7
PND 7	19.3±1.3	19.9±1.3	19.0±2.1	17.8±1.0
PND 11	29.9±1.5	31.2±2.1	30.3±2.8	28.5±1.4
PND 14	37.5±1.8	39.2±2.4	38.4±3.2	36.1±1.7
PND 18	48.0±3.2	50.7±3.3	49.3±4.5	46.6±2.3
PND 21	60.0±4.0	63.0±4.1	61.0±5.4	57.8±2.2
No. of offspring examined	27	27	27	27
PND 28	108.4±7.8	108.9±8.6	105.2±8.3	102.4±5.9*
PND 35	172.5±11.0	169.1±12.4	166.4±12.3	164.4±9.5*
PND 42	242.3±14.5	238.3±19.0	232.1±17.6	233.7±14.1
PND 49	297.3±18.2	295.5±22.5	286.1±20.4	290.8±17.0
PND 56	363.9±21.3	361.6±26.2	349.6±25.9	356.7±20.9
PND 63	418.6±24.6	419.5±32.4	404.3±29.8	413.0±25.8
PND 70	462.5±26.7	462.9±37.1	445.5±33.5	456.0±29.2
PND 77	489.4±28.5	491.2±37.5	469.4±34.9	482.6±34.3

Abbreviations: OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^a Mean ± S.D.

**P* < 0.05, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 2**Body weight changes of female offspring exposed to ochratoxin A**

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.12	0.6	3.0
No. of offspring examined	11	11	11	11
PND 4	11.0±1.1 ^a	11.2±1.2	11.3±1.3	10.8±0.7
PND 7	18.4±1.1	19.1±1.6	19.0±1.9	17.8±1.0
PND 11	29.1±1.8	30.2±2.4	30.7±3.0	27.9±1.4
PND 14	36.7±1.9	37.8±2.6	38.3±3.2	35.5±1.7
PND 18	47.3±2.4	49.0±3.6	49.4±4.1	45.8±2.3
PND 21	57.5±4.0	59.6±4.2	60.1±4.9	56.4±2.2
No. of offspring examined	10	10	10	10
PND 28	99.6±5.3	100.1±7.6	101.5±8.9	93.2±2.8*
PND 35	147.7±8.6	147.0±10.4	145.7±12.6	138.6±7.1
PND 42	184.3±12.3	187.5±13.7	179.7±21.6	175.1±10.1
PND 49	208.4±13.6	212.6±14.9	204.1±15.6	200.9±16.0
PND 56	237.0±16.3	241.3±17.0	234.1±18.4	232.5±18.0
PND 63	257.0±21.2	264.8±20.4	258.3±20.1	258.0±21.5
PND 70	275.4±23.7	284.3±24.5	278.3±21.7	278.6±24.2
PND 77	286.9±27.2	299.0±24.2	290.8±22.5	293.8±32.8

Abbreviations: OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^aMean ± S.D.

* $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 3**Reproductive parameters, body and organ weights of dams exposed to ochratoxin A from early gestation to the end of lactation**

	OTA in diet (ppm)				
	0 (Control)	0.12	0.6	3.0	
No. of dams examined	11	11	11	11	
Reproductive parameters					
No. of implantation sites	14.3±2.1 ^a	14.4±1.7	15.0±1.9	15.4±1.6	
No. of live offspring (PND 0)	13.4±2.5	13.4±1.9	13.1±3.9	13.5±2.4	
Body and organ weights at PND 22					
Body weight (g)	319.5±16.3	315.9±28.9	324.5±28.7	320.6±21.5	
Brain weight	Absolute (g)	1.90±0.09	1.96±0.08	1.98±0.12	1.97±0.08
	Relative (g/100g BW)	0.60±0.03	0.62±0.04	0.61±0.05	0.62±0.05
Kidney weight	Absolute (g)	2.08±0.12	1.99±0.16	2.09±0.14	1.97±0.16
	Relative (g/100g BW)	0.65±0.03	0.64±0.06	0.66±0.05	0.62±0.04
OTA intake (µg/kg BW/day)					
Gestation period	0	8.0±0.4	39.3±3.5	203.6±11.4	
Postnatal period	0	16.1±1.3	76.0±9.0	378.6±29.0	

Abbreviations: BW, body weight; OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^aMean ± SD.

Table 4**Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring exposed to ochratoxin A during gestation and lactation**

		OTA in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Male offspring on PND 21					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)		59.5 ± 4.0 ^a	62.8 ± 5.2	60.3 ± 5.8	56.7 ± 2.6
Brain weight	Absolute (g)	1.50 ± 0.04	1.52 ± 0.06	1.52 ± 0.04	1.52 ± 0.03
	Relative (g/100g BW)	2.54 ± 0.16	2.45 ± 0.08	2.51 ± 0.21	2.69 ± 0.10**
Kidney weight	Absolute (g)	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.55 ± 0.02*
	Relative (g/100g BW)	1.05 ± 0.07	1.01 ± 0.05	1.06 ± 0.05	0.96 ± 0.03*
Female offspring on PND 21					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)		57.0 ± 4.3	58.9 ± 3.7	59.7 ± 4.7	55.8 ± 2.7
Brain weight	Absolute (g)	1.48 ± 0.04	1.47 ± 0.05	1.47 ± 0.06	1.45 ± 0.04
	Relative (g/100g BW)	2.62 ± 0.20	2.51 ± 0.18	2.47 ± 0.20	2.60 ± 0.11
Kidney weight	Absolute (g)	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.67 ± 0.05	0.56 ± 0.03*
	Relative (g/100g BW)	1.11 ± 0.09	1.06 ± 0.07	1.13 ± 0.08	1.01 ± 0.07*
Male offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)		483.5 ± 29.3	497.5 ± 35.8	454.4 ± 41.9	493.8 ± 32.9
Brain weight	Absolute (g)	2.08 ± 0.06	2.09 ± 0.10	2.07 ± 0.09	2.10 ± 0.08
	Relative (g/100g BW)	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.02
Kidney weight	Absolute (g)	3.16 ± 0.39	3.05 ± 0.27	2.94 ± 0.45	2.93 ± 0.33
	Relative (g/100g BW)	0.65 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.65 ± 0.08	0.59 ± 0.05
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)		286.9 ± 27.2	299.0 ± 24.2	290.8 ± 22.5	293.8 ± 32.8
Brain weight	Absolute (g)	1.94 ± 0.10	1.96 ± 0.08	1.95 ± 0.09	1.99 ± 0.07
	Relative (g/100g BW)	0.68 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.08
Kidney weight	Absolute (g)	1.88 ± 0.17	1.86 ± 0.19	1.86 ± 0.14	1.77 ± 0.24
	Relative (g/100g BW)	0.66 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.64 ± 0.02	0.60 ± 0.06

Abbreviations: BW, body weight; OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 5**Histopathological findings of dams exposed to ochratoxin A from gestation day 6 to day 21 after delivery**

		OTA in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Dams					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain					
	Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Renal proximal tubular epithelial cells					
Cortical tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	3 (3/0/0)
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	2 (2/0/0)

Abbreviations: OSOM, outer stripe of outer medulla; OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^a Total number of animals which exhibited abnormality.

^b Number of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

Table 6

Histopathological findings of PND 21 offspring exposed to ochratoxin A during gestation and lactation

		OTA in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Male offspring					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain					
	Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Renal proximal tubular epithelial cells					
Cortical tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) [†]
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) [†]	1 (1/0/0)
OSOM tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	7** (6/1/0) ^{††}
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	10** (10/0/0) ^{††}	10** (0/10/0) ^{††}
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Female offspring					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Renal proximal tubular epithelial cells					
Cortical tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	1 (1/0/0)	5 (5/0/0) [†]
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	2 (2/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	8** (8/0/0) ^{††}
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	7** (7/0/0) ^{††}	10** (1/9/0) ^{††}
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)

Abbreviations: OSOM, outer stripe of the outer medulla; OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^aTotal number of animals which exhibited abnormality.

^bNumber of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Fisher's exact probability test.

[†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Mann-Whitney's *U*-test.

Table 7

Histopathological findings of PND 77 offspring exposed to ochratoxin A during gestation and lactation

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Male offspring				
No. of animals examined	10	10	10	10
Brain				
Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Renal proximal tubular epithelial cells				
Cortical tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	7** (7/0/0) ^{††}	10** (0/10/0) ^{††}
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Male offspring on PND 77				
No. of animals examined	10	10	10	10
Renal proximal tubular epithelial cells				
Cortical tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) ^{††}	10** (0/10/0) ^{††}
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)

Abbreviations: OSOM, outer stripe of the outer medulla; OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^aTotal number of animals which exhibited abnormality.

^bNumber of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Fisher's exact probability test.

^{††} $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Mann-Whitney's *U*-test.

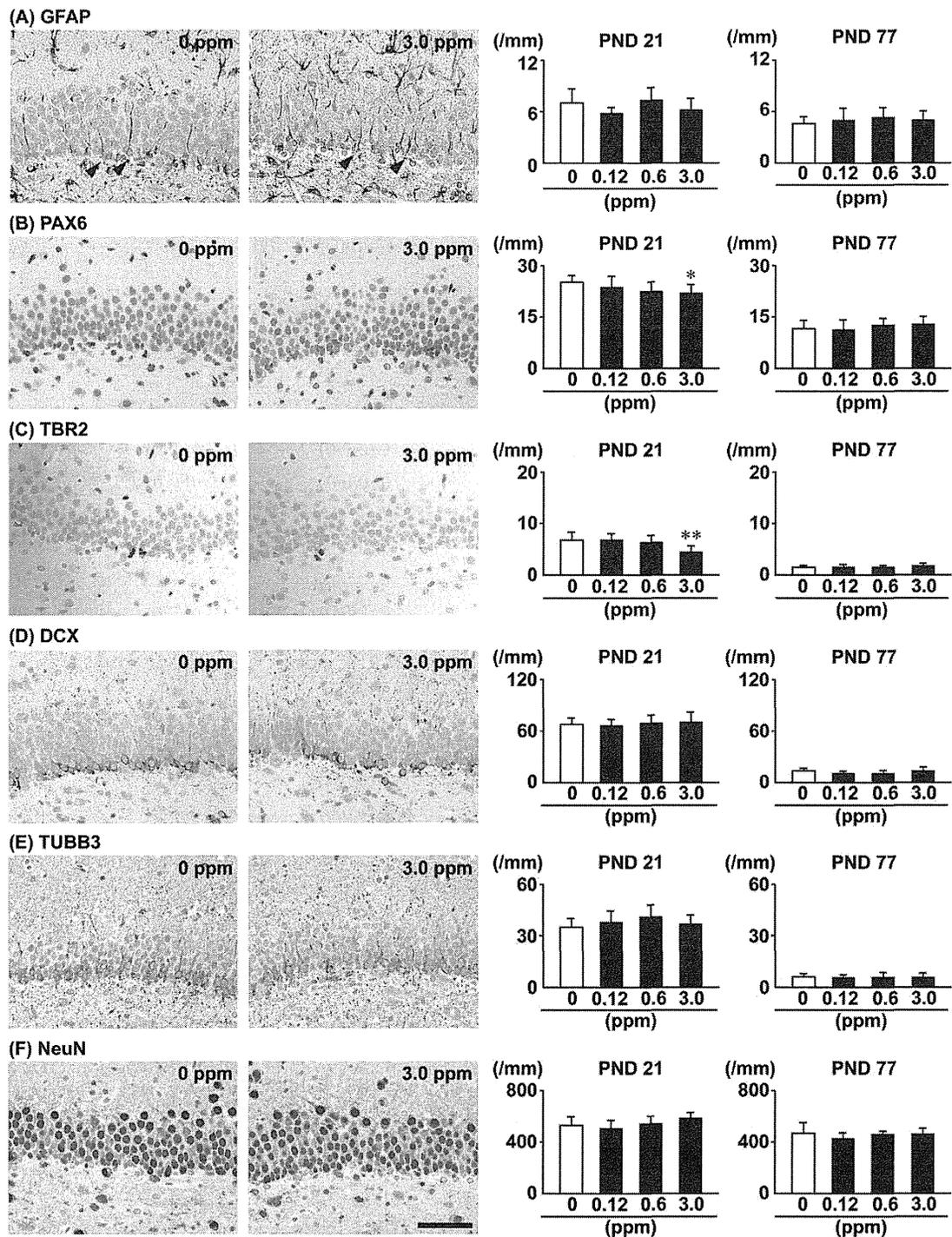


Figure 2

Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to ochratoxin A. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the SGZ. (B) Paired box 6 (PAX6) in the SGZ. (C) T box brain 2 (TBR2) in the SGZ. (D) Doublecortin (DCX) in the SGZ. (E) Tubulin, beta 3 class III (TUBB3) in the SGZ. (F) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10/group. * P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

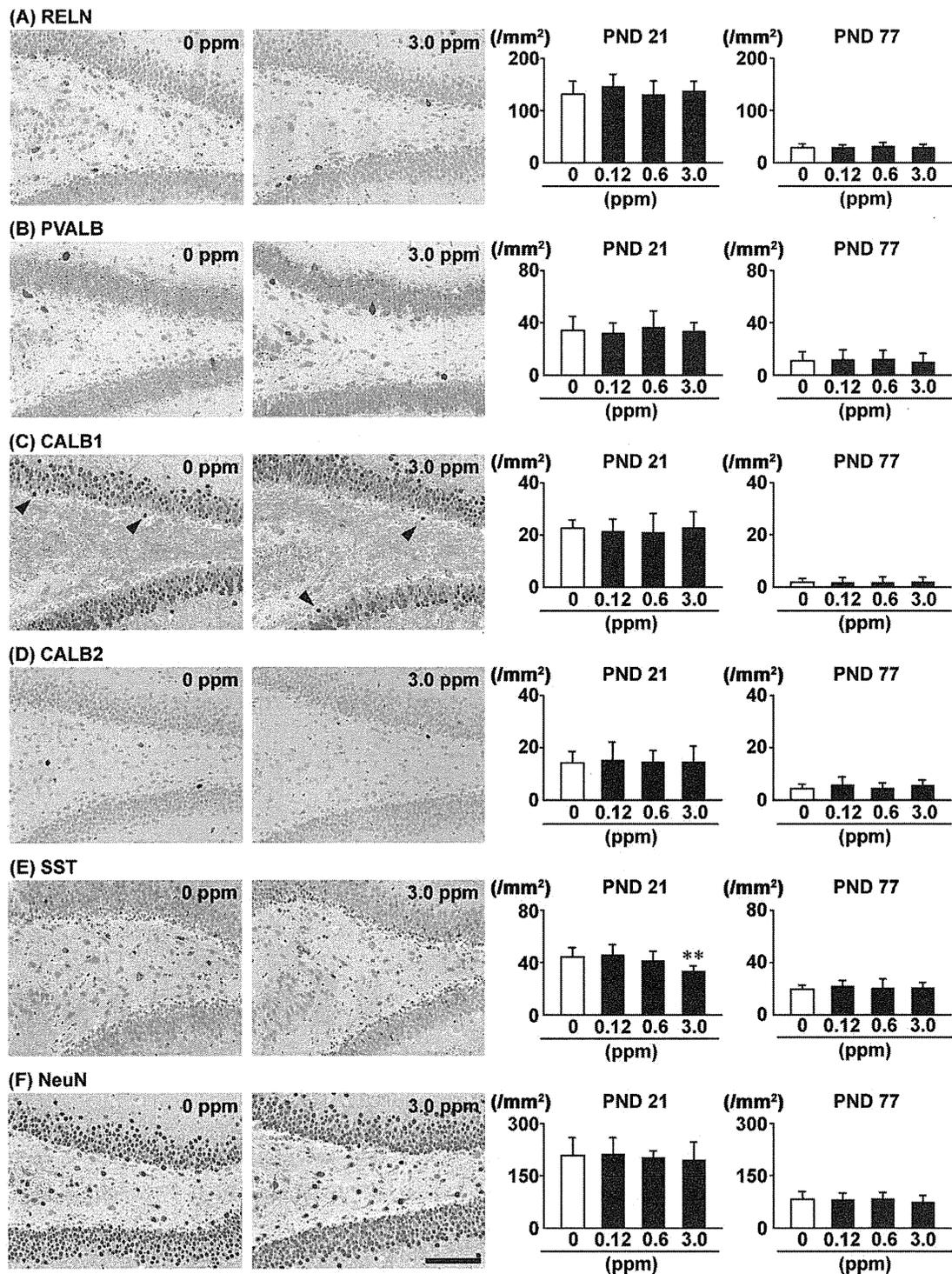


Figure 3

Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to Ochratoxin A. (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin (CALB1). (D) Calretinin (CALB2). (E) Somatostatin (SST). (F) NeuN. Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 200 \times ; bar = 100 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group. ** P < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

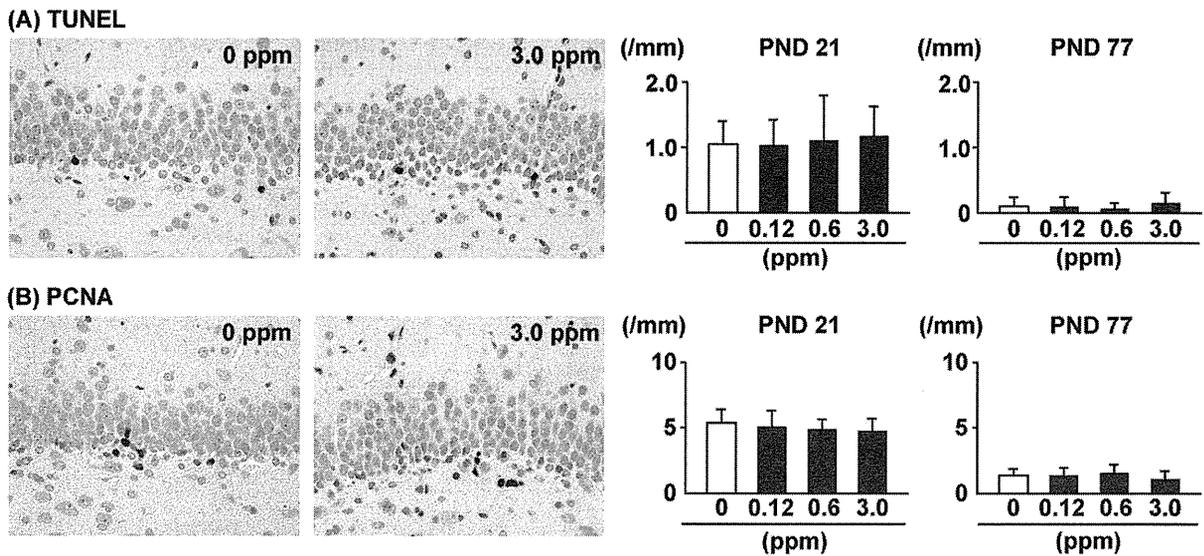


Figure 4

Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to ochratoxin A. (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of positive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group.

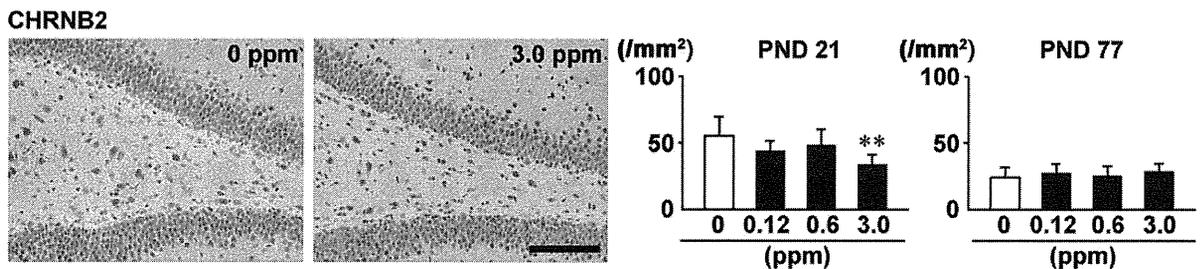


Figure 5

Distribution and number of immunoreactive cells for cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal) (CHRN2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to ochratoxin A. Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 \times ; bar = 100 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group. ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

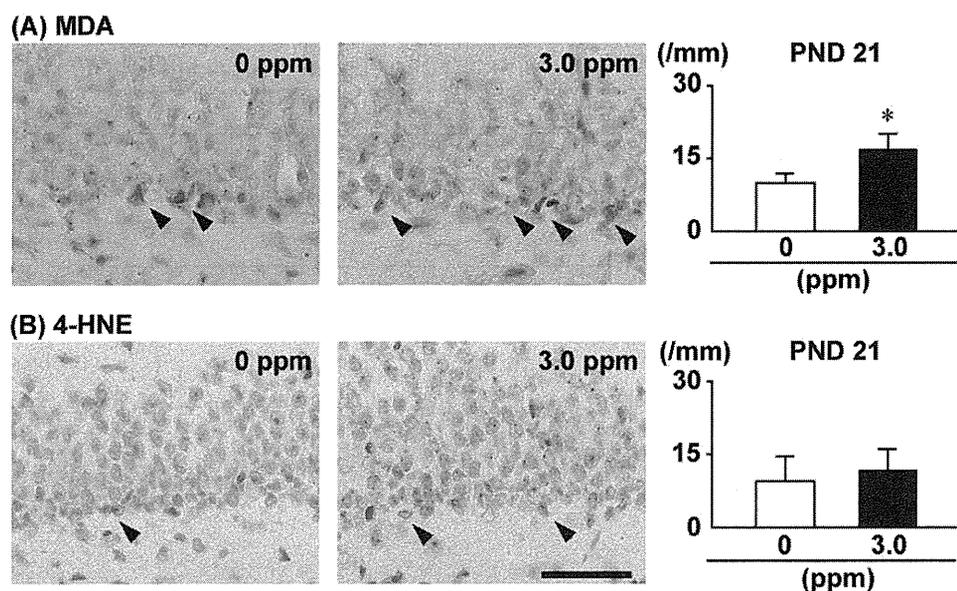


Figure 6

Distribution and number of immunoreactive cells for lipid peroxidation end products in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 offspring exposed to ochratoxin A. (A) Malondialdehyde (MDA). (B) 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 600 \times ; bar = 40 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group. ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Student's t -test or Aspin-Welch's t -test.

Table 8**Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to ochratoxin A**

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)		3.0	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Neuronal stage-defining markers in granule cell lineages				
<i>Pax6</i>	1.01± 0.12 ^a	1.01± 0.18	1.63± 0.72	1.44± 0.46
<i>Eomes</i>	1.03± 0.28	1.04± 0.29	9.66± 5.18**	8.55± 3.71**
Interneuron-related gene				
<i>Sst</i>	1.03± 0.26	1.02± 0.23	3.54± 1.93*	3.10± 1.37*
Neurotrophic factor-related gene				
<i>Bdnf</i>	1.01± 0.16	1.01± 0.13	2.22± 0.55**	2.03± 0.54**
Glutamatergic receptors				
<i>Gria1</i>	1.02± 0.20	1.02± 0.19	4.39± 1.29**	3.95± 1.04**
<i>Gria2</i>	1.03± 0.24	1.02± 0.21	3.30± 0.84**	2.97± 0.60**
<i>Grin2a</i>	1.00± 0.10	1.01± 0.14	3.11± 0.77**	2.82± 0.72**
Acetylcholine-synthesizing enzyme and cholinergic receptors				
<i>Chat</i>	1.00± 0.49	1.09± 0.46	1.25± 0.68	1.10± 0.63
<i>Chrna7</i>	1.03± 0.24	1.02± 0.20	1.43± 0.39	1.29± 0.31
<i>Chrbn2</i>	1.02± 0.22	1.03± 0.28	0.65± 0.13**	0.59± 0.14**
Serotonin-synthesizing enzyme and serotonergic receptors				
<i>Tph2</i>	1.00± 0.11	1.01± 0.15	5.02± 1.58**	4.58± 1.52**
<i>Htr1a</i>	1.02± 0.23	1.01± 0.17	4.55± 1.76**	4.19± 1.50**
<i>Htr4</i>	1.04± 0.30	1.04± 0.30	2.73± 0.82**	2.57± 0.75**
DNA repair-related genes				
<i>Ogg1</i>	1.02± 0.21	1.02± 0.24	1.79± 0.42**	1.62± 0.28**
<i>Sirt1</i>	1.01± 0.13	1.01± 0.14	1.48± 0.28**	1.33± 0.17**
<i>Tp53</i>	1.03± 0.24	1.04± 0.27	1.96± 0.57**	1.75± 0.33**

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal); *Chrbn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal); *Eomes*, eomesodermin; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); *Gria2*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2); *Grin2a*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1); *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Htr1a*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, *Htr2a*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled; *Htr3a*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic; *Htr4*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4, G protein-coupled; *Ogg1*, 8-oxoguanine DNA glycosylase; OTA, ochratoxin A; *Pax6*, paired box 6; *Sirt1*, sirtuin 1; *Sst*, somatostatin; *Tph2*, tryptophan hydroxylase 2; G protein-coupled; *Tp53*, tumor protein p53.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table S1**Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CB-955	1:500	Microwaving, pH6.0 ^a	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K (Calretinin)	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CRT01/ O.N.40	1:100	Microwaving, pH6.0	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2	CHRN2	Rabbit	Polyclonal	n.a.	1:300	Autoclaving, pH6.0 ^b	Bioss Inc. (Woburn, Massachusetts, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG ₁	GA5	1:200	None	Millipore Corporation (Temecula, CA, USA)
4-Hydroxynonenal	4-HNE	Mouse	Monoclonal IgG _{1κ}	HNE-J2	1:100	Autoclaving, pH 9.0 ^c	Japan Institute for the Control of Aging (Shizuoka, Japan)
Malondialdehyde	MDA	Mouse	Monoclonal, IgG ₂	1F83	1:200	Autoclaving, pH 9.0	Japan Institute for the Control of Aging
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	A60	1:100	None	Millipore Corporation
Paired box 6	PAX6	Rabbit	Polyclonal IgG ₁	n.a.	1:200	Autoclaving, pH6.0	LifeSpan Biosciences, Inc.
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG ₁	PARV-1 9	1:1000	Microwaving, pH6.0	Millipore Corporation
Phospho-TrkB (phospho Y816)	p-TRKB	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Microwaving, pH6.0	Osenses (Keswick, Australia)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal	n.a.	1:600	Microwaving, pH6.0	Abcam Inc.
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH6.0	Abcam Inc.
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	TuJ-1	1:500	Microwaving, pH6.0	Abcam Inc.

^a Microwaving at 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

^b Autoclaving at 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

^c Autoclaving at 121 °C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Dako).

厚生労働科学研究費補助金研究事業
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

分担研究者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター特任教授

研究要旨

これまでの研究によってT-2 トキシンは免疫系への影響のみならず循環機能に対する影響があることも明らかになっている。平成 25～26 年度にかけて T-2 トキシンの自由経口摂取による全身機能影響を心拍数、体温、活動量（運動量）を指標にして観察したところ、12 ppm および 6 ppm では、心拍数レベルと体温レベルおよびそれらの日周リズムに明瞭な変化が認められたが、3 ppm および 0 ppm ではそれらの変化が認められなかった。そこで、平成 27 年度はより正確な最小毒性量を知る目的で、6 ppm と 3 ppm の中間の 4.5 ppm を選び影響の有無を明らかにする実験を行った。観察手法は平成 25～26 年度と同様にテレメトリー法によって行った。

その結果、4.5 ppm の T-2 トキシンの混餌の摂取によって、心拍数は摂取開始後 2 日目で有意な増加を示し、その後 4 日目、5 日目で漸次減少した。摂取終了後（3 日間）も減少が認められ 0 ppm 群に比べて有意差が示された。T-2 トキシンの摂取期間中（5 日間）に 6 匹中 1 匹（17%）で心拍数の日周リズムにおける自己相関係数の 30%以上の減少が認められた。また、摂取期間中は明期における体温の低下傾向が観察された。これらの実験成績から、4.5 ppm の T-2 トキシンの混餌はラットの全身機能に影響を及ぼすことが明らかになった。

A. 研究目的

T-2 トキシンは心臓血管系や自律神経系機能に影響を及ぼすことがこれまでの研究で明らかにされている。昨年度までの研究で、T-2 トキシンを含む餌（以下、T2 混餌）を自由経口摂取したラットの心電図、体温、運動量をテレメトリー法で測定した結果、12 ppm および 6 ppm の混餌で、心拍数および体温に明瞭な変化が生じるが、3 ppm の混餌ではそれらに明らかな変化が生じないことがわかった。この結果から、6 ppm と 3 ppm の間に影響閾値が生じることが示唆された。そこで平成 27 年度は、4.5 ppm の混餌摂取による影響の有無を明らかにすることを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1. T-2 トキシン経口摂取試験

I. T-2 トキシンの濃度

T-2 トキシンの濃度は 4.5 ppm とし、8 匹のラットに自由摂取させた。対照群（0 ppm-T-2 トキシン群）はすでに実験を行っているため、本年度は設けなかった。

II. T-2 トキシンの混餌作製

T-2 トキシンは昨年度と同様 T-2 トキシン標準品（和光純薬）を用いた。ラット用粉末飼料（オリエンタル酵母、MF）を用いて、T-2 トキシンの最終含有濃度が 4.5 ppm になるように飼料（T-2 トキシン混餌）を作製した。T-2 トキシン混餌は粉餌専用給餌器（夏目製作所、KN-675-4）に所定量を入れてケージ内で自由摂食させた。

III. 試験プロトコルおよびデータ取得

すべての実験群で成熟雄ラット (Slc: Wistar; 8週齢) にラット用小型テレメーター送信機 (DSI社、TA11CTA-F40) を全身麻酔下で外科手術によって皮下に埋入した。1週間の術後回復期の後、3日間、通常餌の条件下で心電図、皮下体温、活動量の記録 (投与前対照記録) を行った後、T-2 トキシン摂取群では T-2 トキシン混餌を5日間にわたって連続給与した。その後 T-2 トキシンを含まない通常粉餌に切り替えさらに5日間飼育した。この期間中、上記の指標の記録を連続して行った。データは各ラットで5分間の間隔で10秒間ずつの自動サンプリングを専用のデータ取得・解析システム (Dataquest A.R.T) を用いて行った。また、同時に心電図専用解析ソフト (ソフトロン社、SBP2000U) を用いて心電図波形を連続記録した。なお、摂餌、飲水は自由摂取とし、専用飼育チャンパー内の温度を 23°C、明暗周期は 8:00 (点灯) - 20:00 (消灯) に維持した。通常餌と T-2 トキシン混餌との間の切り替えは 11:00~12:00 の時間帯に行った。

IV. 心拍数、体温、運動量の周期分析

連続取得データをもとに 13 点移動平均を行った。T2 混餌摂取前、摂取中、摂取後のそれぞれ3日間について、自己相関係数 (コレログラム) を求めた。

V. 統計分析

T2 混餌摂取前、摂取中および摂取後の心拍数、体温、運動量の変化を一元配置分散分析 (繰り返しあり) および多重比較 (Bonferroni test) を用いて解析した。P<0.05 で有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

テレメーター送信機の埋め込み手術に際しては苦痛を生じないように全身麻酔下で行った。手術後は無菌的なインキュベーター内で保温しながら回復を行った。実験終了後は全身麻酔 (深麻酔) による安楽死を行った。

C. 研究結果

テレメーター送信機を装着した 8 匹のラットのうち、記録状況が安定して良好なラット 6 匹を選び、解析に用いた。心拍数 (回/分)、体温 (°C) および運動量 (回/分) に関する解析結果は以下の

とおりである。

1) 心拍数の変化

1日の平均心拍数 (±SD) を T2 混餌摂取前 (Pre)、摂取期間 (T2)、摂取後 (Post) のそれぞれの期間平均で見ると、413.5 (±8.2)、411 (±8.5)、381.5 (±15.0) であった (P<0.01, ANOVA)。Pre と T2 の間では有意差がなかった (P=0.11) が、Pre と Post、T2 と Post の間には有意差 (P<0.005) がみられた。なお、心拍数は T-2 トキシン摂取開始後 2 日目に軽度増加した後、それ以降は減少する経過を示した。

心拍数は明暗周期の影響を強く受けるため、明期および暗期に分けて解析すると以下のとおりであった。

明期: Pre、T2、Post でそれぞれ 387.8 (±7.5)、388.0 (±7.7)、370.9 (±6.5) を示した (P<0.001, ANOVA)。Pre と T2 の間では有意差がなかったが (P=1.0)、Pre と Post、T2 と Post の間には有意差 (P<0.001) が示された。

暗期: Pre、T2、Post でそれぞれ 444.3 (±8.2)、441.3 (±8.2)、426.6 (±6.9) を示した (P<0.001, ANOVA)。Pre と T2 の間では有意差がなかったが (P=0.93)、Pre と Post、T2 と Post の間には有意差 (P<0.001) が示された。

2) 心拍数の周期性の変化

心拍数の日周リズムに関して、周期 (2π、時間) および自己相関係数を分析した。その結果、周期については Pre、T2、Post でそれぞれ 24.15 (±0.28)、23.83 (±0.35)、23.78 (±0.38) であった (P>0.05, ANOVA)。自己相関係数は、Pre、T2、Post でそれぞれ 0.48 (±0.10)、0.38 (±0.20)、0.40 (±0.07) であった (P<0.05, ANOVA)。Pre と T2 の間では有意差 (P<0.01) が示された。また、T2 と Post の間においても有意差 (P<0.05) がみられた。

3) 体温の変化

体温の変化に関して、Pre、Post、T2 のそれぞれ5日間の平均値は、37.08 (±0.40)、36.83 (±0.44)、36.69 (±0.46) を示した (P<0.005, ANOVA)。Pre と T2 の間 (P<0.05) および Pre と Post の間 (P<0.005) で有意差が認められた。

体温の低下はとくに T-2 トキシンの摂取開始後 3~5 日目の明期に明瞭であった。6 匹中 1 匹では、

T-2 トキシン摂取前に比べて平均 0.3°C以上の明期体温の低下が観察された。

4) 体温の周期性の変化

6匹中1匹ではPost期間において体温の日周リズムが消失し、自己相関係数が得られなかった。

体温リズムの平均周期(時間)は Pre、T2、Post のそれぞれで 23.64 (±0.54) (n=6)、23.60±0.5) (n=6)、23.48 (±0.44) (n=5) であった。自己相関係数は、Pre (n=6)、T2 (n=6)、Post (n=6 ; 1匹では0) のそれぞれで 0.58 (±0.04)、0.48 (±0.22)、0.43 (±0.22) であったが、各期間の間で有意差はみられなかった。

5) 運動量の変化

運動量リズムの周期性(時間)は、Pre、T2、Post の各々の期間で1匹ずつが不明瞭であった。周期性がはっきりしている個体 (n=5) の平均は Pre、T2、Post の 23.73 (±0.31)、23.83 (±0.46)、23.10 (±0.92) であり、明瞭な差は観察されなかった。自己相関係数は、周期性がみられない個体を0とした場合、Pre、T2、Post のそれぞれで、0.31 (±0.19)、0.35 (±0.17)、0.37 (±0.20) であった。運動量への影響は観察されなかった。

6) 摂食量および体重

摂食量 (g) は、Pre、T2、Post のそれぞれの期間において 16.1 (±3.9)、13.4 (±5.1)、17.1 (±3.0) であった (P<0.05、ANOVA)。体重 (g) は実験終了時の測定のみであるが、243.3 (±23.4) であった。

D. 考察

本年度は、4.5 ppm の T-2 トキシンを含む混餌を自由経口摂取したラットにおける全身影響(心電図、活動量および体温)をテレメトリー法を用いて観察した。

昨年度までと同様に T-2 トキシン摂取前、摂取中および摂取後の全期間において心拍数、活動量および体温(皮下温)はいずれも暗期(20:00-8:00)に高く、明期(8:00-20:00)に低くなる日周リズムを発現した。

心拍数は T-2 トキシンの摂取期間終了後には摂取前および摂取中に比べて減少する傾向が示された。この減少は昨年度までの実験で 12 ppm および 6 ppm の混餌摂取においても観察されているが、

4.5 ppm ではこれらの濃度に比べて心拍数の減少度が低かった(総合報告参照)。心拍数の周期(時間)に関しては影響がみられなかったものの、自己相関係数は T-2 トキシン混餌摂取期間中に有意に減少したこと、また 6匹中1匹では摂取期間中の日周リズムが消失したことから 4.5 ppm の曝露では自律神経系を含む心拍リズムに影響がもたらされるものと考えられる。運動量の周期性には影響がみられなかったことから、心拍数に認められた変化は運動量に起因する二次的な効果ではないものと思われる。

体温は T-2 トキシン混餌の摂取前に比べて、摂取期間中および摂取後は低下する傾向が認められたが、とくに明期における体温低下が強い傾向が観察された。夜行性動物であるラットのエネルギー代謝は暗期に高く明期に低下するため、明期では T-2 トキシンの影響が暗期に比べてより強く表れやすいものと思われる。我々が過去に行ったラット心筋細胞への T-2 トキシンの作用効果に関する研究では、 $6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ といった低濃度でもミトコンドリア電子伝達系に対する抑制影響が観察されている。4.5 ppm 混餌といった比較的高濃度の T-2 トキシン摂取下では、こうしたミトコンドリア機能への影響によるエネルギー代謝の低下が体温低下の一要因として関与する可能性が考えられる。

E. 結論

昨年度までの実験で 3 ppm、6 ppm、12 ppm の T-2 トキシン混餌を自由経口摂取したラットにおいて、6 ppm 以上の濃度で心拍数および体温に影響が生じることが明らかになった。今年度は影響がみられた 6 ppm と影響がみられなかった 3 ppm の間の濃度である 4.5 ppm で観察したところ、心拍数および体温に変化が認められた。4.5 ppm の T-2 トキシンは全身の生理的機能に影響を与えることが明らかになった。

参考文献

- 1) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Kumagai S, Tsubone H. (2011): Arrhythmias and alterations in autonomic nervous function induced by deoxyvalenol (DON) in unrestrained rats. J

Toxicol Sci. 36(4):453-460.

- 2) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Ando K, Tsubone H. (2012): Reevaluation of arrhythmias and alterations of the autonomic nervous activity induced by T-2 toxin through telemetric measurements in unrestrained rats. Toxicol Mech Methods. 22: 662-673.
- 3) Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.: Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats. J Toxicol Sci. 38(3): 495-502. 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

1. 学会発表

1) 局 博一・花房真和：T-2 トキシシ混餌摂取ラットにおける心拍、体温、運動量の変化。第77回日本マイコトキシシ学会。2015年9月15日（山形県鶴岡市）。

2) 局 博一：マイコトキシシの毒性評価。第77回日本マイコトキシシ学会。2016年1月8日（神奈川県川崎市）。

3. 論文発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

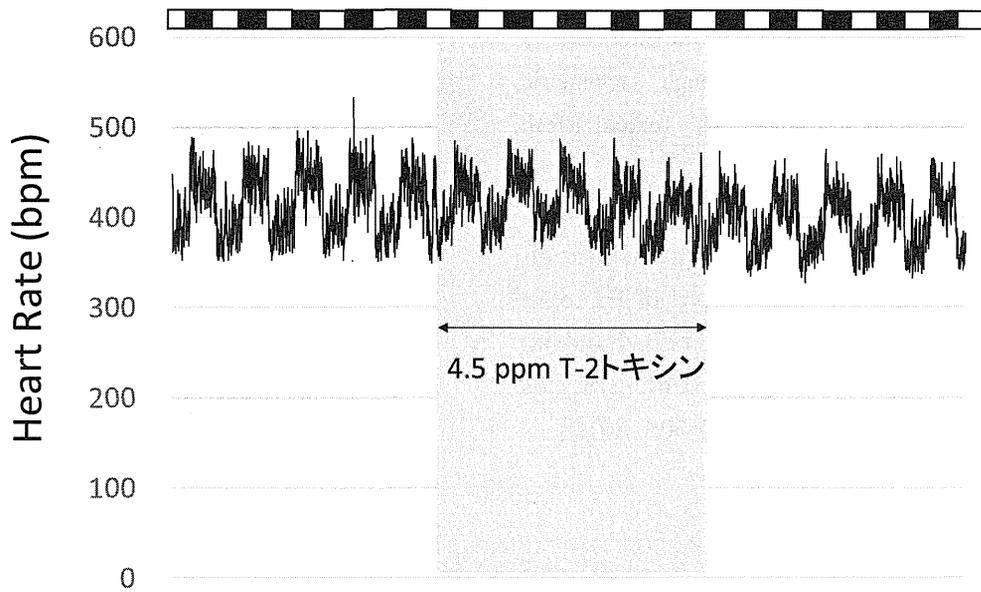


図1 4.5 ppm T-2 トキシシの自由経口摂取による心拍数の変化
6匹の平均値の推移を示す。

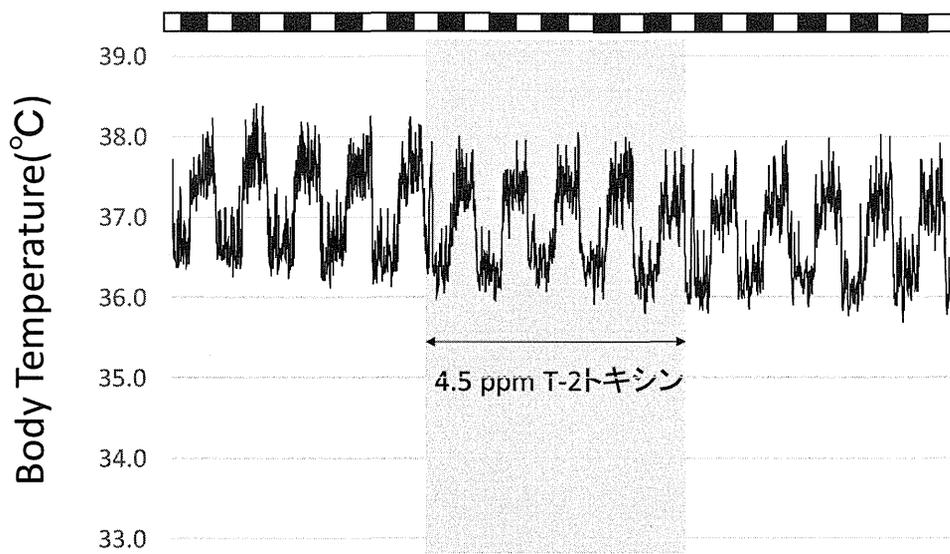


図2 4.5 ppm T-2 トキシシの自由経口摂取による体温の変化
6匹の平均値の推移を示す。

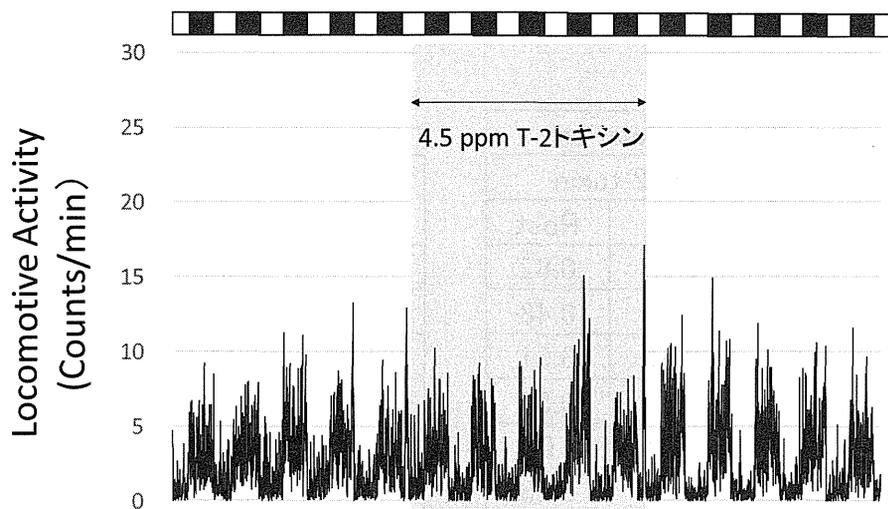


図3 4.5 ppm T-2 トキシンの自由経口摂取による運動量の変化
6匹の平均値の推移を示す。

表1. 4.5 ppm-T-2 トキシン群における心拍数の自己相関係数(左)とその周期性(右)の変化

RAT	Auto-correlation Coefficient		
	Pre	T2	Post
1	0.56	0.44	0.51
2	0.49	0.51	0.52
3	0.31	0.36	0.42
4	0.48	0.41	0.39
5	0.44	0.00	0.00
6	0.59	0.56	0.59
mean	0.48	0.45	0.49
SD	0.10	0.20	0.21

RAT	Periodicity (hour)		
	Pre	T2	Post
1	24.00	23.67	23.42
2	23.92	23.58	24.17
3	24.58	24.42	24.00
4	24.00	23.58	23.33
5	24.42	—	—
6	24.00	23.92	24.00
mean	24.15	23.83	23.78
SD	0.28	0.35	0.38

表 2. 4.5 ppm-T-2 トキシン群における体温の自己相関係数とその周期性の変化

Rat	Auto-correlation			Rat	Periodicity(hr.)		
	4.5 ppm-T2 toxin				4.5 ppm-T2 toxin		
	Pre	T2	Post		Pre	T2	Post
1	0.60	0.58	0.62	1	23.83	23.83	23.50
2	0.60	0.58	0.48	2	23.83	23.42	23.83
3	0.50	0.56	0.51	3	22.58	23.75	23.83
4	0.56	0.57	0.53	4	24.08	23.42	23.50
5	0.59	0.04	0	5	23.92	22.83	-
6	0.62	0.55	0.43	6	23.58	24.33	22.75
Mean	0.58	0.48	0.43	Mean	23.64	23.60	23.48
SD	0.04	0.22	0.22	SD	0.54	0.50	0.44

表 3. 4.5 ppm-T-2 トキシン群における運動量の自己相関係数とその周期性の変化

Rat	Auto-correlation			Rat	Periodicity(hr.)		
	4.5 ppm-T2 toxin				4.5 ppm-T2 toxin		
	Pre	T2	Post		Pre	T2	Post
1	0.32	0.43	0.44	1	23.92	24.50	22.80
2	0.16	0.19	-	2	24.67	24.00	-
3	0.25	0.39	0.54	3	23.58	23.75	24.70
4	0.22	0.36	0.38	4	23.75	24.08	24.50
5	0.38	0.47	0.35	5	24.17	23.67	22.90
6	0.39	0.45	0.53	6	23.10	23.25	22.90
Mean	0.29	0.38	0.45	Mean	23.87	23.88	23.56
SD	0.09	0.10	0.09	SD	0.53	0.42	0.95